

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18346

研究課題名(和文) 中枢神経軸索終末部における単一シナプス小胞動態の可視化

研究課題名(英文) Imaging single synaptic vesicles at CNS presynaptic terminals

研究代表者

緑川 光春 (Midorikawa, Mitsuharu)

同志社大学・研究開発推進機構・助教

研究者番号：60632643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの大型中枢神経軸索終末部であるカリックス型シナプスを標本とし、全反射蛍光顕微鏡を用いて細胞膜直下におけるシナプス小胞の開口放出、およびそれ以前の動態を可視化することによって、シナプス小胞が開口放出される前の細胞膜近傍での振る舞いを直接測定することに成功した。また、開口放出からエンドサイトーシスにいたるまでの動態を小胞膜と小胞タンパク質の両面から同時測定した。

研究成果の概要(英文)：We used total internal reflection fluorescence microscopy at the live isolated calyx of Held terminal and visualized fusions and pre-fusion activities of single synaptic vesicles just beneath the plasma membrane. We also measured vesicle membrane and protein retrieval at the same time and in the same cell at the calyx of Held from rats and mice, and found that there may be two distinct modes of membrane and vesicle protein retrieval depending on the activity strength. We also found an important signaling pathway to couple vesicle membrane and vesicle protein uptakes.

研究分野：神経科学

キーワード：開口放出 全反射蛍光顕微鏡 イメージング シナプス小胞

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室は、主に電気生理学的手法を用い、ラットやマウスの脳幹聴覚伝導路に存在する脳幹聴覚系カリックス型シナプスを標本として伝達物質放出機構の解明を進めてきた(Sakaba and Neher, 2001; Sakaba et al., 2005; Wadel et al., 2007; Hosoi et al., 2009)。シナプス前終末である軸索終末部において、シナプス小胞は伝達物質放出部位への動員(ドッキング)、伝達物質放出への分子的準備(プライミング)、形質膜への融合と伝達物質の細胞外への放出、エンドサイトーシスによる小胞の再回収、伝達物質再充填と小胞再利用への準備、といった一連のサイクルを経て再利用されると考えられる(図1)。

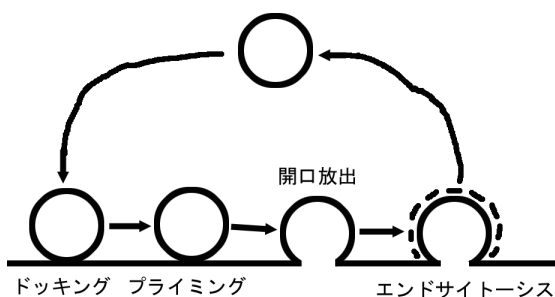


図1 シナプス小胞サイクルの模式図

この一連のサイクルにおいて、最も研究が進んでいるのは開口放出の刺激に対する特性である。開口放出が生じる際にはシナプス小胞がシナプス前部の細胞膜と融合するため、膜容量測定法を用いることによって細胞膜面積の増大を膜容量の増加として測定することが可能である。カリックス型シナプス前終末は中枢神経系において膜容量測定法が適用できる数少ない標本の一つであり(Sun & Wu, 2001; Sakaba, 2006)。開口放出の特性は伝達物質を受け取る側であるシナプス後細胞の応答からも高い精度で推定することが可能である(Sakaba & Neher, 2001)。また、エンドサイトーシスによる小胞膜の再取り込みについても同じく膜容量測定法によって膜容量の減少として測定することが可能であり、研究が進められている(Hosoi et al., 2009; Midorikawa et al., 2014)。

しかし、開口放出の前段階であるドッキング、プライミングに関しては、電氣的にこれを検出する手段がなく、光学的にも特に神経系においては十分な解像度を持つ測定法が存在しなかったため、固定標本を用いた電子顕微鏡による形態研究に依存している状況であった。

2. 研究の目的

本研究はまず 中枢神経系であるカリックス型シナプス前終末からの単一シナプス小胞の開口放出を可視化し、開口放出され

る前のシナプス小胞がどのような準備段階を経て開口放出に至るのかについて検証し、開口放出関連タンパク質の神経シナプス前終末における動態を測定することを目的とした。

3. 研究の方法

標本として軸索終末部が大きく、イメージングの適用が容易なカリックス型シナプスを標本として実験を行った。シナプス小胞を蛍光標識し、細胞膜直下のシナプス小胞の動態を全反射蛍光顕微鏡によって観察した。開口放出以前の段階としてのドッキング、プライミングの実体を明らかにすべく、シナプス小胞が開口放出までに細胞膜直下においてどのようにふるまうのかを可視化した。

また、カリックス型シナプス前終末に存在するシナプス小胞タンパク質であるシナプスタグミンを pH 感受性蛍光物質の cypHer によって蛍光標識した。シナプス小胞内は細胞外に比べて酸性状態であるので、シナプスタグミンの動態をシナプス小胞内外の pH の差を利用することによって測定し、開口放出関連タンパク質が開口放出後にどのように再取り込みされるのかを測定した。

4. 研究成果

哺乳類中枢神経の神経終末からの単一シナプス小胞の開口放出を初めて可視化することに成功した。活動電位を発生する一般的な中枢神経においては、ミリ秒以下の現象である活動電位に反応して開口放出を起こすために、シナプス小胞は細胞膜直下において即時応答可能な状態で準備されており、活動電位とそれに伴うカルシウムイオンの流入に対して素早く開口放出を起こすと考えられてきたが、これを直接証明した実験はこれまでに存在しなかった。この研究ではラットのカリックス型シナプスを標本とし、全反射蛍光顕微鏡(図2)を用いて細胞膜直下におけるシナプス小胞の開口放出、およびそれ以前の動態を可視化することによって、シナプス小胞が開口放出される前の細胞膜近傍での振る舞いを直接測定した。

実験の結果、刺激に応じて即時放出されるシナプス小胞の数を大きく上回る数のシナプス小胞が細胞膜直下に係留されており、開口放出が生じて細胞膜直下のシナプス小胞が減少した後の細胞深部からのシナプス小胞の動員速度(3~4秒)は、従来の電気生理学的手法によって推定された即時放出可能なシナプス小胞の再充填速度(300ミリ秒)よりも大幅に遅いことが分かった。ケージド試薬を用いて細胞内のカルシウム濃度を瞬間的に上昇させ、かつその状態を数秒間にわたって保持した場合にどのようなシナプス小胞が開口放出されるのかを測定したところ、即時に放出される一群のあとに、細胞膜

に係留されていたが即時には放出されなかったシナプス小胞が約 300 ミリ秒の時定数で放出されることが分かった。これらの結果から、即時放出可能なシナプス小胞の素早い充填は、すでに細胞膜直下に係留されているが放出可能な状態にはなかったものが、おそらく分子的な要因によって放出可能な状態に遷移することによって成し遂げられていることが分かった(図 3)。この結果は論文として発表し(Midorikawa and Sakaba, 2015)、Neuron 誌上の Preview で紹介された(Hallermann, 2015, Neuron, doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.028.)。

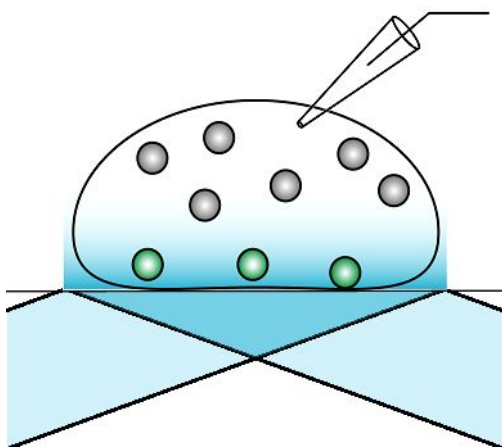


図 2 全反射蛍光顕微鏡
細胞膜直下(約 100nm 以内)のシナプス小胞(緑)のみに励起光を照射することができる。

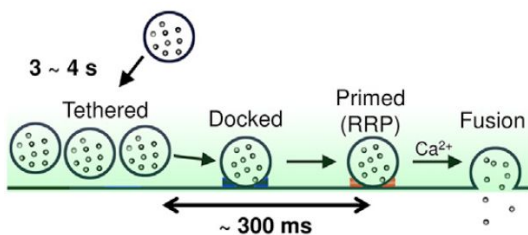


図 3 シナプス小胞の細胞膜への係留から開口放出に至るまでの時間経過の模式図。
Midorikawa and Sakaba, 2015 より

また、小胞膜の融合と回収の動態を膜容量測定法を用いた電気生理学的手法によって、小胞タンパク質が細胞膜表面にあるか小胞内にあるのかを pH 依存性蛍光色素で標識した抗体を用いたライブイメージングによって測定した。シナプス小胞内の pH は細胞外に比べて低いことが知られており、エンドサイトーシスによって取り込まれた小胞と放出された小胞の pH の差を利用した。開口放出からエンドサイトーシスにいたるまでの動態を小胞膜と小胞タンパク質の両面から同時測定したのは、本研究が初めてである。

実験の結果、刺激の強度が弱いときには小胞膜と小胞タンパクの一つであるシナプトグミン 2(Syt2)の回収の時間経過はよく一致していた。一方で、刺激強度を強くすると Syt2 は依然として小胞膜と共に回収されていたが、回収された液胞内における再酸性化が遅いことが分かった。このことから、刺激の強度によって二つの異なるエンドサイトーシスの経路が存在することが強く示唆された。さらに、カルシウム結合タンパク質であるカルモジュリン(CaM)、開口放出関連タンパク質の一つである Munc13-1 を含む Ca^{2+} -CaM-Munc13-1 経路を阻害すると、小胞膜の回収の時間経過には影響なく、Syt2 の回収の時間経過のみが遅くなることが分かった。この結果から、 Ca^{2+} -CaM-Munc13-1 経路は Syt2 を小胞膜と共に回収するようにタンパク質の選別を行う機能を持っているが、膜回収自体には関与していないことが分かった(図 4)。本研究は、ドイツのマックスプランク実験医学研究所(Lipstein, Brose)、マックスプランク生物物理化学研究所(Hua, Lin)との国際共同研究によって行われた。この研究は論文として発表し(Okamoto et al., 2016, 責任著者) eLife 上の Insight で紹介された(Gross & von Gersdorff, 2016, eLife)。

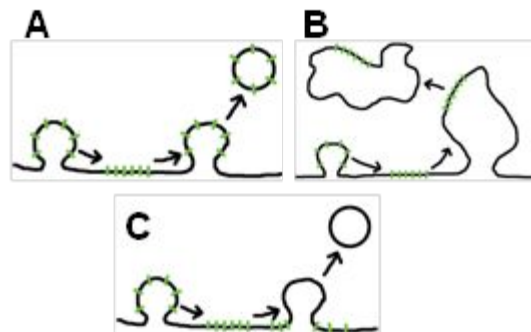


図 4 3つの異なる小胞膜、小胞タンパク回収経路

A. 弱い刺激を与えた際には、小胞膜は再び小胞として細胞内に取り込まれ、小胞タンパク質 Syt2 (緑線)も膜と共に取り込まれる。
B. 強い刺激を与えた際には、小胞膜は大型液胞として取り込まれ、小胞タンパク質 Syt2 も膜と共に取り込まれる。
C. Ca^{2+} -CaM-Munc-13-1 経路を阻害すると、小胞膜の回収には影響がないが、小胞タンパク質 Syt2 は細胞膜表面に取り残される。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Okamoto Y, Lipstein N, Hua Y, Lin KH, Brose N, Sakaba T, Midorikawa M. (2016). Distinct modes of endocytotic presynaptic membrane and protein uptake at the calyx of Held terminal of rats and mice. eLife, pii: e14643. doi: 10.7554/eLife.14643. (査読あり)

2. Midorikawa M., Sakaba T. (2015). Imaging exocytosis of single synaptic vesicles at a fast CNS presynaptic terminal. Neuron, 88(3):492-8. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Midorikawa M. Live cell imaging of single synaptic vesicles at mammalian CNS presynaptic terminals. 第 94 回日本生理学会大会シンポジウム アクトシティ浜松(浜松). 2017 年 3 月 29 日.

2. Midorikawa M and Sakaba T. Dynamics of single synaptic vesicles at the presynaptic terminals of mammalian central synapses. 第 39 回日本神経科学大会パシフィコ横浜(横浜). 2016 年 7 月 20 日.

3. Midorikawa M. Exocytosis and pre-exocytotic activities of single synaptic vesicles at the calyx terminal. JSPS Core-to-Core シンポジウム “Mechanisms of synaptic transmission”, パリ(フランス), 2015 年 9 月 17 日.

4. Midorikawa M and Sakaba T. Visualizing kinetics of single synaptic vesicles at the calyx-type presynaptic terminal. 第 38 回日本神経科学大会 神戸国際展示場(神戸). 2015 年 7 月 28 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
緑川 光春(MIDORIKAWA, Mitsuharu)
同志社大学・研究開発推進機構・助教
研究者番号： 60632643

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：